ご使用に際しては、本添付文書をよくお読みください

体外診断用医薬品

承認番号　21200AMZ00590000

※※2015年10月改訂（第９版）
※2014年10月改訂（第８版）

マトリックスメタロプロテイナーゼ3キット
パナクリア®MMP-3「プレート」

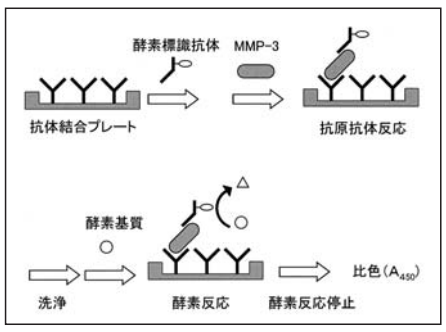
〔全般的な注意〕
1．本品は、体外診断用医薬品ですので、それ以外の目的には使用できません。
2．測定結果に基づく臨床判断は、臨床症状や他の検査結果などと合わせて担当医師が総合的に判断してください。
3．この添付文書に記載された使用方法に従って使用してください。記載された使用方法および使用目的以外での使用については、測定値の信頼性を保証しかねます。
4．測定には使用目的に記載してある検体種を使用してください。
※5．MMP-3標準品はヒト由来成分が含まれており、感染の危険性がありますので、ご使用に際しては感染性のあるものとして十分注意して取扱ってください。
※6．各種自動機器でのご使用にあたっては、必ず使用する機器の取扱説明書をよくお読みください。

〔形状・構造等（キットの構成）〕

No.	構成試薬	性　状	規　格	備　　考
①	抗体結合プレート	乾　燥	96ウェル×１枚	マウス抗ヒトマトリックスメタロプロテイナーゼ-3モノクローナル抗体結合プレートです。
②	酵素標識抗体	濃縮液	２mL×１本	ペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒトマトリックスメタロプロテイナーゼ-3モノクローナル抗体（28μg/バイアル）を含みます。
③	発色液	液　状	15mL×１本	3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（1.5mg/バイアル）および過酸化水素水（30%）（3.8μL/バイアル）を含みます。
④	停止液	液　状	15mL×１本	
⑤	緩衝液	液　状	25mL×２本	
⑥-1	MMP-3標準品	凍結乾燥	１mL用×１本	12.5ngのヒトマトリックスメタロプロテイナーゼ-3を含みます。
⑥-2	MMP-3標準品	凍結乾燥	１mL用×１本	50ngのヒトマトリックスメタロプロテイナーゼ-3を含みます。
⑥-3	MMP-3標準品	凍結乾燥	１mL用×１本	200ngのヒトマトリックスメタロプロテイナーゼ-3を含みます。
⑥-4	MMP-3標準品	凍結乾燥	１mL用×１本	400ngのヒトマトリックスメタロプロテイナーゼ-3を含みます。
⑥-5	MMP-3標準品	凍結乾燥	１mL用×１本	800ngのヒトマトリックスメタロプロテイナーゼ-3を含みます。
⑦	濃縮洗浄液	濃縮液	0.5L用×２本	

〔使用目的〕
血清中のマトリックスメタロプロテイナーゼ-3（MMP-3）の測定

〔測定原理〕
1．測定原理
本キットは、MMP-3分子上の異なる部位を認識する２種類のモノクローナル抗体を用いた１ステップサンドイッチ酵素免疫測定法（Enzyme Immunoassay；EIA法）に基づき、血清中MMP-3を測定するキットです[1)]。血清中MMP-3、マウス抗ヒトMMP-3モノクローナル抗体結合プレートおよびペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒトMMP-3モノクローナル抗体を同時に反応させると、三者の複合体が形成されます。MMP-3を介して抗体結合プレートに結合している酵素量を発色剤（3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン）の存在下、過酸化水素を基質として測定します。酵素量は試料中のMMP-3濃度に依存するので、含有量既知の標準液を用いて作成した標準曲線から、試料中のMMP-3濃度を求めることができます。



2．特徴
(1) 本キットに用いた２種類のモノクローナル抗体は、検体中MMP-3を特異的に認識します。
(2) 酵素標識抗体は、Fab'ヒンジ領域の-SH基に酵素を標識したものであり、非特異的結合が抑えられています。

〔操作上の注意〕[2)]
1．測定試料の性質、採取法
(1) 検体は新鮮な血清を使用してください。
(2) 血清分離後、直ちに測定できない場合は次のように保存してください。冷蔵および凍結保存でそれぞれ１週間および12ヶ月まで安定です。
(3) 検体の凍結融解の繰り返しは避けてください。
2．妨害物質
(1) エチレンジアミン四酢酸（EDTA）添加検体は測定値が低値を示しますので使用できません。
(2) ヒトフィブリノーゲン、ヒトグロブリン、ヒトアルブミン、ビリルビン、ヒトヘモグロビン、乳び、リウマチ因子（RF）による測定値への影響は認められません。
(3) 検体によっては、まれに非特異反応や反応の妨害等により、正確な結果が得られない場合があります。測定結果が疑われる場合には、再測定や希釈試験により確認してください。
3．その他
(1) 本品はマイクロプレートリーダー専用品です。
(2) すべての試薬は、使用前に予め反応温度にしておき、溶解する際は泡立てないように穏やかに混和してください。
(3) 標準曲線は測定ごとに作成してください。
(4) 洗浄操作をプレート自動洗浄機を用いて行う場合、洗浄機により最適な設定方法および洗浄回数が異なる場合がありますので、予め最適条件を確認することをお勧めします。
(5) 吸光度は、ウエル間の誤差を補正するため、対照波長を630nm近辺に設定して測定してください。
(6) 検体の吸光度が標準曲線の範囲内に入らない場合は、『緩衝液』を用いて検体を希釈し再測定してください。
(7) 検体数に応じて抗体結合プレート（８ウェル×12）を用意し、測定に使用しない抗体結合プレートは元のアルミシールバッグに入れておいてください。

〔用法・用量（操作方法）〕
1．使用器具および装置
(1) ピペット（１mL）
(2) マイクロピペット（40，100，120，160μL）
(3) マルチピペット（40，100，120，160μL）
(4) メスシリンダー（500mL）
(5) U字プレート（希釈用プレート）
(6) プレート洗浄機
(7) マイクロプレートリーダー（450nm）

※※2．試薬の調製法
自動機器は、AP-960（協和メデックス株式会社）、BEP-Ⅲ（シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社）が使用可能です。使用する自動機器によって、試薬の調製法、操作法に変更がありますので注意してください。
また、調製後２～８℃で保存した試薬は、使用前に反応温度に戻してから使用してください。

試　薬	調　製　法	調製後の安定性
1. 標準曲線用標準液	⑤『緩衝液』１mLを⑥-1～⑥-5『MMP-3標準品』に加え溶解し、標準曲線用標準液とします。MMP-3濃度は12.5、50、200、400、800ng/mLとなります。０ng/mL用には⑤『緩衝液』を使用します。	２～８℃ １ヶ月
2. 酵素標識抗体液	⑤『緩衝液』と②『酵素標識抗体』を10：１（AP-960を用いる場合は８：１）の割合で混合し、酵素標識抗体液とします。	２～８℃ １ヶ月
3. 洗浄液	精製水450mLに⑦『濃縮洗浄液』を１本（50mL）を加えて混和し、洗浄液とします。	２～８℃ １ヶ月

3．測定（操作）法
※※(1) 操作法一覧表
サンプルの希釈

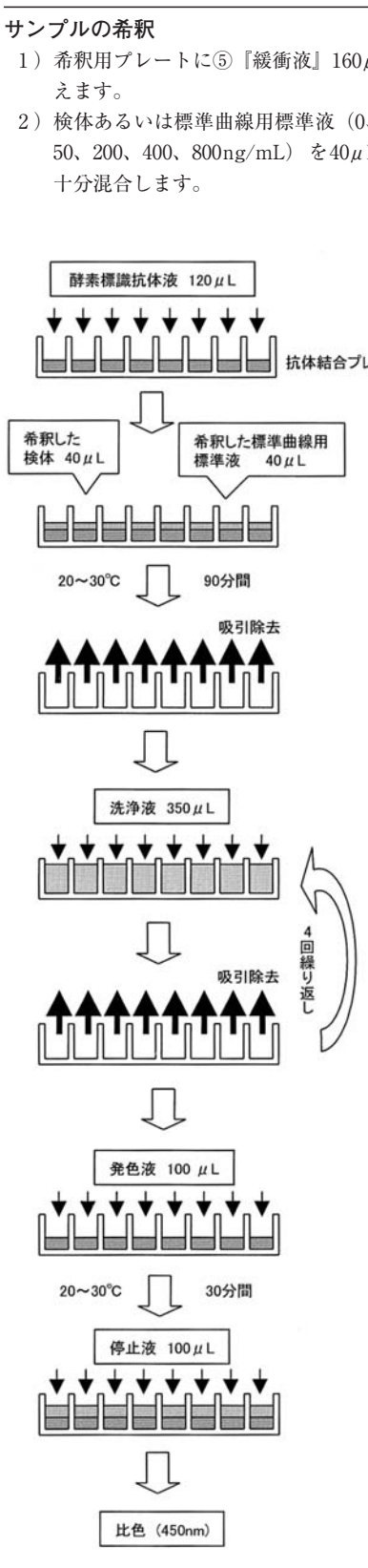
	用手法	AP-960	BEP-Ⅲ
希釈用プレート	１ウェル	１ウェル	１ウェル
緩衝液	160μL	180μL	160μL
検体あるいは標準曲線用標準液（0、12.5、50、200、400、800ng/mL）	40μL	20μL	40μL

注）十分に混合してください。

測定

	用手法	AP-960	BEP-Ⅲ
抗体結合プレート	１ウェル	１ウェル	１ウェル
酵素標識抗体液	120μL	100μL	120μL
サンプル	40μL	100μL	40μL
［抗原抗体反応］（第１反応）	十分に混合後、20～30℃で90分間静置		
［洗　浄］	反応液を吸引後、洗浄液を用いて洗浄		
	350μL	300μL	300μL
	４回	４回	５回
発色液	100μL		
［酵素反応］（第２反応）	20～30℃で正確に30分間静置		
停止液	100μL		
［比　色］	波長450nmで吸光度を測定		

(2) 反応操作手順
用手法の反応操作手順を示します。なお、自動機器については２．試薬の調製法および３．(1) 操作法一覧表を参照してください。



サンプルの希釈
1）希釈用プレートに⑤『緩衝液』160μLを加えます。
2）検体あるいは標準曲線用標準液（0、12.5、50、200、400、800ng/mL）を40μL加え、十分混合します。

抗原抗体反応（第一反応）
3）①『抗体結合プレート』に酵素標識抗体液120μLを加えます。
4）希釈した検体あるいは標準曲線用標準液40μLを加え、十分振とうし混合します。
5）20～30℃で正確に90分間静置します。

洗浄
6）反応液を吸引除去します。
7）洗浄液350μLを加えます。
8）洗浄液を吸引除去します。さらに、７）および８）を３回繰り返してください。
（洗浄回数は合計４回となります。）

酵素反応（第二反応）
9）③『発色液』100μLを加えます。
10）20～30℃で正確に30分間静置します。
11）④『停止液』100μLを加え、酵素反応を停止させます。

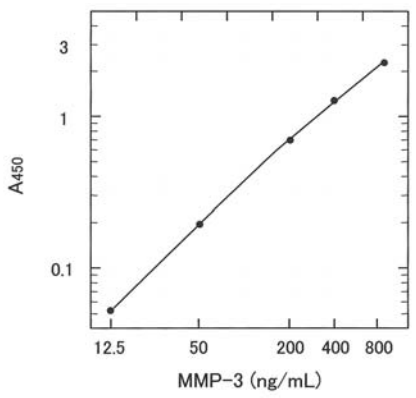
比色
12）マイクロプレートリーダーで、波長450nmの吸光度を測定します。
（対照波長は630nm近辺に設定してください。）

4．MMP-3濃度の算出法

（1）グラフ用紙（両対数）の横軸にMMP-3濃度（12.5～800ng/mL）を、縦軸に吸光度（450nm）をとり、標準曲線用標準液の各MMP-3濃度に対応する吸光度から0ng/mLの吸光度を差し引いた数値をプロットします。

（2）5点を通るなめらかな曲線を引くことにより、標準曲線を作成します。

（3）各検体の吸光度に対応するMMP-3濃度（ng/mL）を、標準曲線から読み取ります。



〔測定結果の判定法〕

参考基準範囲[3)]

男性：36.9～121ng/mL（N＝285）

女性：17.3～59.7ng/mL（N＝241）

なお、血清中MMP-3値は、癌症例でまれに高値を示す場合があります。また、腎機能障害の伴う疾患で高値を示す場合があります。同様に、SLE症例でも高値を示す場合があります。これはSLEに合併する血管炎、関節炎によるものではなく、WHO組織分類のびまん性糸球体腎炎に相当するⅣ型で高値を示すことから、腎の排泄障害により血清中MMP-3が増加するものと思われますのでご注意ください。

〔臨床的意義〕

MMP-3は滑膜細胞や軟骨細胞が産生し、その特異的基質が軟骨を構成するプロテオグリカンであることから、慢性関節リウマチ（RA）の関節組織破壊に関与する酵素として注目されていました[4-6)]。

一般的に、RAの病態の進展に伴い、滑膜は炎症反応を呈して増殖がおこります（増殖性滑膜病変）。RAの関節組織破壊は、滑膜の炎症、増殖に伴い、産生増加をきたしたマトリックス分解酵素の作用の結果として、起こるとされています[5-7)]。

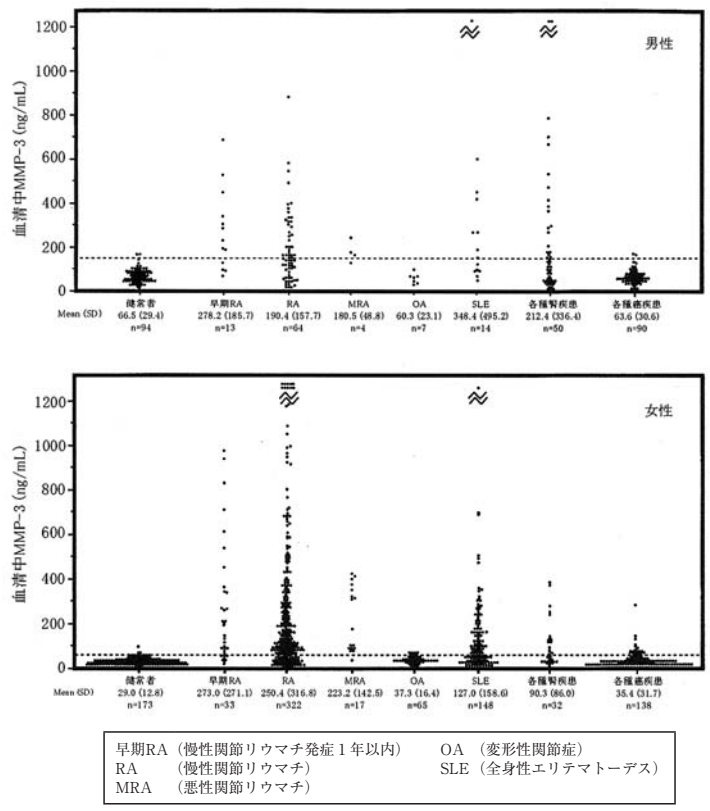
これまでの基礎検討から、MMP-3は、RAで滑膜の増殖に伴い、滑膜表層細胞で発現・産生され、そのマトリックス分解作用の結果、関節破壊をきたすと考えられています[8-10)]。滑膜表層細胞で産生されたMMP-3が関節液中に貯留し、関節液中のMMP-3は血管やリンパ管を経由して血中に移行し血清中MMP-3値が上昇すると考えられています[11-13)]。

このようなMMP-3の生体内での挙動より、血清中MMP-3測定は早期RAの滑膜増殖と関節破壊の予後予測の指標として用いうる可能性が示唆されています[5-7, 11)]。そこで、当社は血清中MMP-3を測定できる簡便な方法を開発いたしました[1)]。

本キットを用いた血清中MMP-3測定により、以下に示すような成績が得られています[12-16)]。

血清中MMP-3値が滑膜組織内のMMP-3量を反映し、関節破壊をきたす炎症性滑膜を定量的に表すことが示されました。このことから①血清中MMP-3値はRAにおける滑膜増殖の程度を反映していることが示唆されております[15, 16)]。

血清中MMP-3値は早期RA（発症1年以内）でもすでに高値を示します（図1）。なお、早期RAの診断については、厚生省早期リウマチ疫学調査研究班と日本リウマチ学会によりそれぞれ診断基準が提唱されております。また、早期RAの経過観察において、骨破壊をLarsen's scoreで評価すると、血清中MMP-3値が初診時あるいは、初診後1年、初診後2年から3年までの治療経過中に上昇又は高値を維持した症例は進行性で、低下又は低値を維持した症例は非進行性である傾向が認められました[16)]。したがいまして、②早期RAの関節破壊の予後予測のマーカーとして有用であることが示唆されております（図2－4）。



早期RA（慢性関節リウマチ発症1年以内）　OA（変形性関節症）
RA（慢性関節リウマチ）　SLE（全身性エリテマトーデス）
MRA（悪性関節リウマチ）

図1．各疾患における血清中MMP-3値[12-14)]

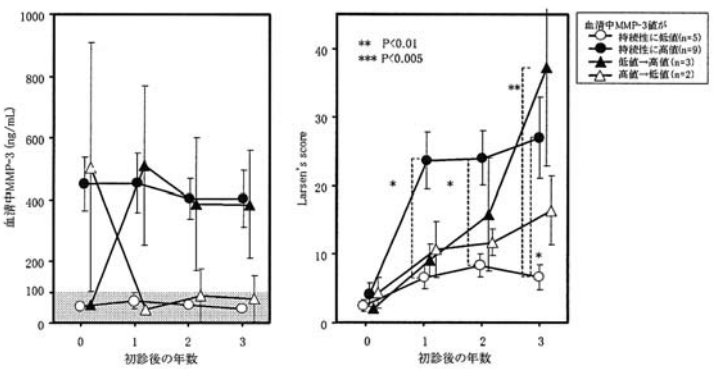


図2．治療経過と血清中MMP-3値〈初診時以降〉

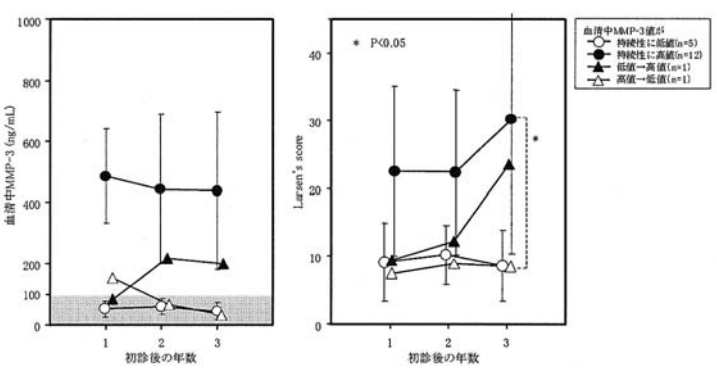


図3．治療経過と血清中MMP-3値〈初診後1年以降〉

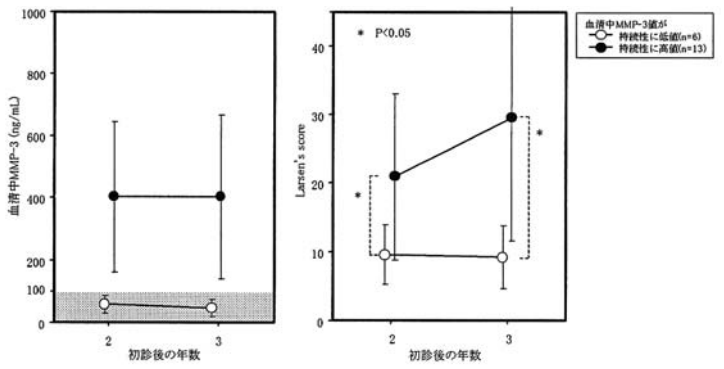


図4．治療経過と血清中MMP-3値〈初診後2年以降〉

〔性能〕

1．性能

所定の操作法に従い測定したとき、以下の性能を示します。

（1）感度

標準曲線上12.5ng/mLおよび800ng/mLの波長450nmでの吸光度値（A_{450}）から0ng/mLのA_{450}を差し引いた値はそれぞれ0.010～0.075および1.4～3.8です。

（2）正確性

濃度既知の管理検体を測定するとき、測定値は既知濃度の100±20%以内です。

（3）同時再現性

同一検体を二重測定で4回同時に測定したとき、測定値の変動係数（CV値）は、10%以下です。

（4）測定範囲

12.5～800ng/mL

※※※2．相関性

本法と既認証品目であるパナクリアMMP-3「ラテックス」（協和ファーマケミカル株式会社）との間で相関性を検討したところ、下記のような結果が得られました。

検体数	相関係数	回帰式
405	0.9758	y = 0.94x + 8.3

3．較正用基準物質

精製MMP-3（社内標準物質）

〔使用上又は取扱い上の注意〕

1．取扱い上（危険防止）の注意

（1）検体は、ウイルス感染の危険性を考慮して取扱ってください。

※（2）MMP-3標準品はHBs抗原、HIV-1，2抗体およびHCV抗体がいずれも陰性であることを確認してありますが、使用に際しては一般の患者検体同様十分注意して取扱ってください。

（3）試薬が誤って目や口に入った場合は、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。

※※（4）酵素標識抗体、緩衝液、濃縮洗浄液には、防腐剤としてプロクリン300が含まれており、皮膚等を刺激する場合があります。もし、皮膚や衣服についた時は速やかに水で洗い流してください。皮膚に炎症を生じた場合は、医師の手当てを受けてください。

（5）停止液（1 mol/L硫酸）が皮膚や衣服に触れないように取扱いに注意してください。

2．使用上の注意

（1）異なるロット番号の試薬を組合わせて使用しないでください。

（2）貯法に指定された温度以外で保存すると、品質が変化して正しい結果が得られないことがありますので、貯法に従い保存してください。

（3）使用期限を過ぎた試薬は、測定値の信頼性を保証しかねますので使用しないでください。

3．廃棄上の注意

（1）使用後の容器は焼却するか、廃棄する場合には、廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物又は産業廃棄物等区分してください。

（2）試薬の廃棄にあたっては、水質汚濁防止法等の規制に留意してください。

※※（3）検体に接触した器具、試薬および試薬容器等は感染の危険があるものとし、オートクレーブ（125℃、1時間）等で滅菌処理するか、又は次亜塩素酸ナトリウム（0.1%）等の消毒液に浸して処理してください。

※（4）検体又は検体を含む溶液が飛散した場合には、次亜塩素酸ナトリウム等によるふき取りと消毒を行ってください。

4．その他の注意

（1）本キット内の容器、試薬等は他の目的に転用しないでください。

（2）異常な検査結果が得られたときは、ご連絡ください。

〔貯蔵方法、有効期間〕

1．貯　　法　2～8℃

2．有効期間　製造後12ヶ月間（使用期限は外箱および容器の表示をご参照ください）

〔包装単位〕

1キット　96ウェル

〔主要文献〕

1．K. Obata et al.：Clin. Chim. Acta, 211, 59-72, 1992.

※※2．協和ファーマケミカル株式会社　社内データ

3．横内敬二ら：新薬と臨床, 50, 215-221, 2001.

4．岡田保典：実験医学, 10, 256-262, 1992.

5．吉原愛雄ら：Monthly Book Orthopaedics, 7, 11-20, 1994.

6．新名正由：リウマチ, 32, 85-95, 1992.

7．M. Shinmei et al.：Seminars in Arthritis Rheum., 19, 16-20, 1990.

8．Y. Okada et al.：J. Biol. Chem., 261, 14245-14255, 1986.

9．Y. Okada et al.：Ann. Rheum. Dis., 48, 645-653, 1989.

10．Y. Okada et al.：Lab. Invest., 66, 680-690, 1992.

11．S. Sasaki et al.：Clin. Rheumatol., 13, 228-233, 1994.

12．Y. Yoshihara et al.：Arthritis Rheum., 38, 969-975, 1995.

13．佐々木哲ら：リウマチ科, 12, 435-443, 1994.

14．神宮政男ら：リウマチ, 35, 15-24, 1995.

15．H. Yamanaka et al.：Arthritis Rheum., 43, 852-858, 2000.

16．山中　寿：平成10年度厚生科学研究費補助金　免疫・アレルギー等研究事業（免疫・アレルギー部門）研究報告書, 227-229, 1998.

〔お問い合わせ先〕

積水メディカル株式会社　学術担当

電話番号 0120－249－977

FAX番号 0120－247－477

販売元　積水メディカル株式会社

東京都中央区日本橋三丁目13番5号

※※ 製造販売元　協和ファーマケミカル株式会社

富山県高岡市長慶寺530番地

TEL 0766-26-4423